

## Zárójelentés

”A karnitin észterek profilszerű meghatározásának jelentősége a humán karnitin metabolizmus vizsgálatában” című, OTKA T 49589 számú pályázathoz (2005-2008)

A pályázat a címben összefoglalt kutatási területet két irányvonalból közelítette meg: egyrészt, a karnitin metabolizmust vizsgáltuk a valódi, azaz súlyos OCTN2 hiányban (klinikai primer karnitin hiányban) manifesztálódó SLC22A5 mutációk keresésével, másrészt, avagy egy másik megközelítési irányként, vizsgáltuk a karnitin metabolizmust tükröző plazma karnitin észter spektrumot az SLC22A5 és olyan természetes variánsainak, polimorfizmusainak vizsgálata segítségével, melyek szintén befolyásolhatták az OCTN2 funkcióit, és következményesen a karnitin homeosztasiszt. A két terület kutatása mindvégig egymás mellett futott.

A karnitintszállító mutációnak keresésében az ország legkülönbözőbb intézeteiből, genetikai ambulanciáiról kaptunk olyan beutalt betegeket, akik szuszpektek voltak a betegségre. Sajnos, a vizsgált esetek közül egy sem volt valódi transzporter hiány. A korábban már felismert SLC22A5 V295X-et eredményező mutáció vélhetően magas előfordulása bizonyos roma subpopulációkban viszont ismételt újabb lehetőségeket teremtett. Hozzájutottunk egy hirtelen csecsemőhalálban elvesztett csecsemő boncolása során eltett, parafinba ágyazott blokkjaihoz. A szöveteket alaposan átnézve a limforetikuláris szövetek (nyirokcsomó, tonsilla, lép, csontvelő, thymus) tanulmányozása specifikus hisztokémiai festési és jelölési eljárások segítségével meglepő eredményt adott: gátolt sejtproliferáció és fokozott apoptózis volt megfigyelhető a tüszők germinális centrumaiban, ami gátolt affinitás-vezérelt B sejt proliferációt igazolt. Ez teljességgel kvadrál azzal a megfigyeléssel, hogy a primer karnitin hiányosokban egy egyértelmű szekunder immundeficiencia figyelhető meg, ismétlődő infekciók szinte valamennyi eset kötelező velejárói (5). A thymus teljesen normális képet adott.

A kutatási periódus második felében ismételt érintkezésbe kerültünk a fenti mutációt hordozó család más tagjaival. Módunkban állt egy primer karnitin hiányos gyermek karnitin profilját vizsgálni elektropray (ESI) tandem tömegspektrometriás (MS/MS) módszerrel (mely módszert egyébként a későbbiekben is vázolt eljárások során ismételt használtuk) a karnitin szupplementáció megkezdése előtt, majd azt követően különböző időpontokban. Az alaphelyzetben döbbenetesen csökkent volt valamennyi karnitin észter szintje, leginkább a szabad karnitiné, ami a lineáris detektálhatóság határát éppen csak átlépte. A karnitin kezelés hatására, noha egyértelmű klinikai javulás volt látható (normalizálódó EKG és szívfunkciók az ultrahangos nyomonkövetéssel) a karnitin észterek csak mérsékelten emelkedtek még pár hónappal a kezelés megkezdése után is, és a további emelkedés is csak nagyon mérsékelt volt a későbbiekben is. Ez egyezett a korábbi megfigyelésekkel, amikor a szabad karnitin szinteket tudták mérni a korábban alkalmazott radiokémiai módszerrel. Módunk volt a két heterozigóta szülő, heterozigóta és normális testvérek plazmáját is vizsgálni; hasonló vizsgálat korábban nem történt az irodalomban. Meglepő eredményként, valamennyi heterozigóta a normál kontrollok karnitin spektrum értékeinek hozzávetőlegesen felét mutatta, tehát egy közel proporcionális csökkenés volt az egyes észterek plazmaszintjében (15). Az eredményeket megkonzultáltuk a Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, Georgia tömegspektrometriás egységével, akik az gyakorlatilag az egész világ felé a külső minőségbiztosítási háttérrel biztosítják. A központ javasolta az eredmények közzétételét, hiszen a szűrés során észlelt profilok értelmezési gyakorlatában ezen eredeti megfigyelések a jövőben egyértelműen segíthetnek.

A karnitin transzporter természetes variánsait több összefüggésben is vizsgáltuk. Felmértük a SLC22A4 és SLC22A5 gén szuszceptibilitási variánsainak előfordulását Crohn betegségben. Több közlemény foglalkozott azzal, hogy bizonyos természetes haplocsoportok mint szuszceptibilitási kombinációk fordulhatnak elő; mi a hazai beteganyagban nem tudtuk ezt megerősíteni, hasonlóan több európai populációhoz (4). Úgyszintén vizsgáltuk hazai populációban az SLC22A4 1672T és SLC22A5 -207C kombinációja által meghatározott TC haplotípust; szintén nem találtuk hajlamosító tényezőnek a másik gyulladásoos bélbetegségben, az ulceratív colitisben (6).

Ezekkel párhuzamosan vizsgáltuk a karnitin észter profil alakulását különböző felszívódási zavarokban, melyek elméleti megközelítés alapján tekinthetők szekunder karnitin hiányállapotoknak, ezen belül olyanban, ahol az SLC22A gének szerepet játszhatnak a patomechanizmusban és olyanokban is, ahol nem. Kezelt felnőtt celiákiásokban a karnitin észter profil még mindig mutatott eltéréseket, ami arra utal, hogy a diéta önmagában klinikailag teljes javuláshoz vezethet, azonban bizonyos laboratóriumi eltérések még mindig a fennálló kórfolyamatra utalhatnak: csökkent az acetil, propionil, butiril, hexanoil, oktanoil, oktenoil, dekanoil, decenoil, lauril, miristoil, miroistenoil, és oleil karnitin szintje a kezelt és egyébként tünetmentes betegekben (1).

Úgyszintén, kezelt ulceratív colitisben még mindig tapasztalhatóak olyan karnitin profil eltérések, melyek asszociálódhatnak még a betegség bizonyos elemeinek fennálltával (2): a betegekben csökkent a propionil, butiril, izovaleril, és ekként az össz rövid szénláncú karnitin észterek plazmaszintje, míg növekedett az oktanoil, dekanoil, miristoleil, palmitoil, palmitoleil, oleil és hidroxil-oleil karnitin szintje, és ezek által az össz közepes- és hosszú szénláncú karnitin észterek plazmaszintje. A betegség pathomechanizmusának részeként említik, hogy zavart bizonyos rövid szénláncú zsírsavak enterális metabolizmusa. Érdekes új, és eddig mások által nem publikált megfigyelésként mi tehát azt tapasztalatuk, hogy mindez tükröződik a plazma karnitin észterekben is.

Vizsgáltuk Crohn betegségben szenvedő betegek csoportjait is SLC22A gén hajlamosítottságra gyermek (3) és felnőtt (4) populációkban. Utóbbi csoportban vizsgáltuk a karnitin észtereket is ESI MS/MS technikával. A hajlamosító-gén vizsgálatok terén azt a megállapítást tehetjük, hogy sem a gyermek, sem a felnőtt populációban a vizsgált polimorfizmusok nem mutattak hajlamosító természetet. Mellékfigyelésként megállapíthattuk, hogy a gyermek NOD/CARD mutációprofilja eltért a felnőttekétől. A karnitin észterek vizsgálata a felnőtt populációban egyébként egy elméleti szempontból is érdekes megfigyelést eredményezett: csökkent a propionil, izovaleril, és butirilkarnitin szintje, míg néhány közép és hosszú szénláncú észter, beleértve az oktenoil, miristoleil, palmitoil, és oleilkarnitin szinteket, emelkedést mutatott betegekben (2). Ez a profil is eltért az eddig ismert valamennyi kóros vagy karakterisztikus karnitin profiltól.

Az előbbieken említett másodlagos karnitin hiányos állapotokkal ellentétben teljesen más jellegű szekunder karnitin hiányt jelenít meg a terhes nő és az újszülött csecsemő. Előbbi vélhetőleg a graviditás jelentette elvonás (az újszülött karnitin készletei a placentán keresztül az anyából származnak), míg az újszülött a karnitin szintézis csaknem teljes hiánya miatt képvisel potenciális karnitin hiányállapotot. Elsőként vizsgáltuk az irodalomban a karnitin észterek profiljának alakulását a terhesség folyamán egészen a szülésig, majd a szülés után a köldökszínór és a megszületett újszülött karnitin profilját is parallel analizáltuk (7). A vizsgálatot egy meglepően dinamikus rendszert fedtek fel: jellegzetesen átalakult a terhes nő karnitin profilja a graviditás során nem-terhes nőkhöz viszonyítva, a profil változott egészen a szülésig. A köldökszínór analízise egy intenzív és szelektív transzporttevékenységet fedett fel mindkét irányba. Az újszülött profilja eltért mind a saját szülői, mind a saját köldökszínór értékektől, ami azt mutatja, hogy az egyes karnitin észterek metabolizmusa azonnal és rendkívül dinamikusán átalakul a megszületés után. Mindezek együtt egy teljesen új

metabolikus komplexre engednek rátekinteni; a méhen belüli magzat, ahogy az tudott, azonnal metabolikus változásokon megy át a megszületés után, ennek elemei tükröződnek a karnitin észterekben is. Ezek a meglepően dinamikus eltérések önmagukban az esetek többségében nehezen értelmezhetőek a jelenlegi tudásanyag mellett, azonban elemei lehetnek egy systems genomics jellegű vizsgálatoknak.

Egy gyakori autoimmun betegség, amelyikben az SLC22A5 génnek bizonyos variánsainak szuszceptibilitási jelleget közöltek, a rheumatoid arthritis. Vizsgáltuk az SLC22A4 C6607T és a RUNX1 G24658C genotípusok eloszlását a betegségben. Nem találtunk a normál populációtól eltérő genetikai variáns halmozottságot, és nem találtuk egyik polimorfizmust sem hajlamosító génként. Tekintettel arra, hogy az említett genetikai variánsok hathatnak a génekről szintetizált transzkriptumokról leírt transzporterek karakterisztikumára, megváltozhat teoretikusan azok funkciója, ami kihathat a plazma karnitin észterekre vagy azok bizonyos elemeire. Miután rendelkezésre állt plazma a betegektől, azt analizáltuk ESI MS/MS módszerrel; azonban nem találtunk polimorfizmus specifikus eltérést a karnitin észter profilban (11).

A negatív eredmény arra készítetett bennünket, hogy próbáljuk a rheumatoid arthritises betegeket csoportosítani hajlamosító génjeik alapján; az alcsoportok képzése esetleg felfedhet olyan további alcsoportokat, amelyeket tagolva, találhatunk olyan subpopulációkat, melyekben mégis szerepet kaphatnak az SLC gének, mint önálló hajlamosítók. Elméleti megfontolások alapján az eredetileg Crohn és ulceratív colitis betegségekre közölt interleukin 23 receptor variánsokat tanulmányoztuk rheumatoid arthritises betegekben is, és azt találtuk, hogy az allélok egy megosztott hajlamosító természetet képviselnek, miután hajlamosítanak a betegség kialakulásában (8). Később, mi magunk szintén kiterjesztésként megfigyeltük, hogy az interleukin 23 receptor gén 3'UTR C2370A allélikus variánsa hajlamosító gén relabáló-remittáló típusú multiplex sclerosisban. Meglepő módon ezen 2008 évi közleményeinkre már 10 fölötti citátum érkezett. A mi megfigyeléseinkkel párhuzamosan, mások további autoimmun betegségekre, mint psoriasis és spondylosis ankylopoetica is felismertek hasonló összefüggést.

Időben a kutatásaink ideje alatt ismerték fel az apolipoprotein A 5 (apoA5) gént és annak polimorfizmusait, valamint azok szerepét a normális és kóros triglicerid metabolizmusban. Tekintettel a triglicerid és a hosszú szénláncú zsírsavak egymást feltételező és egymásra ható metabolizmusára, természetes kiterjesztésként kezelve, vizsgálatokat végeztünk az apoA5 terén is. Számos összefüggésben megerősítettük azt, amit más populációkban részben előtűnt, részben velünk egyidőben mások is megerősítettek: a T-1131C, T1259C, IVS3-476A, és C56G variánsok közül valamennyi minor allél hordozása emelkedett triglicerid szinttel társul egészséges egyénekben valamint strokeban vagy metabolikus szindrómában szenvedőkben (10,12,13). Mintegy kapcsolt megfigyelésként felismertük, hogy számos apoA5 minor allél hajlamosító variáns stroke bizonyos típusaiban vagy metabolikus szindrómában, ezen hatás független a triglicerid metabolizmusra gyakorolt minor allél hatástól. A jelen pályázat szempontjából ezek a megfigyelések iniciatívaként tekinthetőek, további munkák során tervezzük meghatározni a genotipizált, ismert triglicerid szinttel bíró betegekben a genotípus és a karnitin észterek korrelációjának vizsgálatát. Ugyanis, okkal feltételezhetjük, hogy a megváltozott triglicerid metabolizmus kihathat bizonyos karnitin észterek metabolizmusára is.

A mitokondriális betegségek közül több társulhat karnitin metabolizmus eltéréssel. Vizsgáltunk egy ismert, de nagyon ritka mutációt, az A7445G tranzíciót, ami maternális öröklésű halláskárosítottsággal társul. Nem találtunk eltérést a karnitin profilban, azonban szintén kiegészítő megfigyelésként felismertük, hogy a beteg egy addig nem ismert, vélhetőleg ázsiai eredetű haplotípus jelentett (14). Tekintettel a magyarság eredetére, ez a megfigyelés esetlegesen jelentőséggel bírhat további geneológiai vizsgálatokhoz.

A fent említett SLC22A4 és 5 hajlamosító gének valamennyien az 5q31 kromoszóma régióra lokalizálódnak. Hasonlóan a gyulladásos bélbetegségekhez, felvetődött bennünk, hogy a különböző európai populációkban talán azért tapasztalható eltérés az egyes SLC22A genetikai variánsok hajlamosító jelleg között, mert egy kevert, nem osztályozott populáción vizsgáljuk azokat, és esetleg ez a kevert jelleg esetleg elfedhet bizonyos összefüggéseket. Az egyik lehetséges továbblépés a betegek genetikai osztályozása a bélbetegségek terén is. Miután az eredeti közleményt, melyben az SLC géneket hajlamosítónak írták le, 2007-ben újravizsgálták a robosztus genomwide association study-k módszereivel, kiderült, hogy ez valóban így van, bizonyos alcsoportok képzése elengedhetetlen. Ezen információk birtokában mi is újravizsgáltuk a biobankunkat: kiderült, hogy hazai beteganyagunkban az IGR2096a\_1T és IGR2198a\_1 C allélok hajlamosítóak Crohn betegségre (16). Ez az új megközelítés alapot jelent a későbbiekben a karnitin profil újravizsgálásához is. A vizsgálat megtörtént egy további, az IGR2230a\_1 genotípusokra, azonban ezen felosztási megközelítésben sem volt tapasztalható eltérés a vizsgált genotípusok karnitin észter profiljaiban (17).

### Közlemények

1. Bene J, Komlosi K, Gasztonyi B, Juhasz M, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profile in adult celiac disease patients maintained on long-term gluten free diet. *World J Gastroenterol* 2005;11:6671-6675.
2. Bene J, Komlosi K, Havasi V et al. Changes of plasma fasting carnitine ester profile in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006;12:110-113.
3. Bene J, Magyar L, Talian G et al. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:5550-5553.
4. Bene J, Komlosi K, Magyar L et al. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes. *Br J Nutr* 2007;98:345-350.
5. Komlosi K, Havasi V, Bene J et al. Histopathologic abnormalities of the lymphoreticular tissues in organic cation transporter 2 deficiency: evidence for impaired B cell maturation. *J Pediatr* 2007;150:109-111.
6. Magyar L, Bene J, Komlosi K et al. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients. *Pathol Oncol Res* 2007;13:53-56.
7. Talian GC, Komlosi K, Decsi T, Koletzko B, Melegh B. Determination of carnitine ester patterns during the second half of pregnancy, at delivery, and in neonatal cord blood by tandem mass spectrometry: complex and dynamic involvement of carnitine in the intermediary metabolism. *Pediatr Res* 2007;62:88-92.
8. Farago B, Magyar L, Safrany E et al. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:248-250.

9. Illes Z, Safrany E, Peterfalvi A et al. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2008;431:36-38.
10. Kisfali P, Mohas M, Maasz A et al. Apolipoprotein A5 IVS3+476A allelic variant associates with increased triglyceride levels and confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians. *Circ J* 2008;72:40-43.
11. Komlosi K, Talian GC, Farago B et al. No influence of SLC22A4 C6607T and RUNX1 G24658C genotypic variants on the circulating carnitine ester profile in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:61-66.
12. Maasz A, Kisfali P, Jaromi L et al. Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. *Circ J* 2008;72:1065-1070.
13. Maasz A, Kisfali P, Szolnoki Z, Hadarits F, Meleg B. Apolipoprotein A5 gene C56G variant confers risk for the development of large-vessel associated ischemic stroke. *J Neurol* 2008;255:649-654.
14. Maasz A, Komlosi K, Hadzsiev K et al. Phenotypic variants of the deafness-associated mitochondrial DNA A7445G mutation. *Curr Med Chem* 2008;15:1257-1262.
15. Komlósi K, Magyar L, Talián GC et al. Plasma carnitine ester profile in homozygous and heterozygous OCTN2 deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2009; in press.
16. Lakner L, Csengei V, Sarlos P et al. IGR2096a\_1 T and IGR2198a\_1 C alleles on IBD5 locus of chromosome 5q31 region confer risk for Crohn's disease in Hungarian patients. *Int J Colorectal Dis* 2009; in press.
17. Talián G, Lakner L, Bene J et al. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis patients with different IGR2230a\_1 genotypes. *Int J Immunogen* 2009; in press.